

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

ISSN 1518-4269

108

Circular
TécnicaSete Lagoas, MG
Dezembro, 2008**Autores**

Gracielle T. da C. Pinto Coelho
Msc. Fisiologia Vegetal. Doutorando em
Fisiologia Vegetal Embrapa Milho e
Sorgo e Universidade Federal de Lavras
C. Postal 151, CEP 35701-970 Sete
Lagoas-MG

gracielle.costa@gmail.com

Andréa Almeida Carneiro
Ph.D Biologia Molecular. Embrapa Milho
e Sorgo. Cx.Postal 151, CEP 35701-970
Sete Lagoas-MG

andrea@crpms.embrapa.br

Newton Portillo Carneiro
Ph.D Biologia Molecular. Embrapa Milho
e Sorgo. C. Postal 151, CEP 35701-970
Sete Lagoas-MG

newtonc@crpms.embrapa.br

Fátima Vilela Vasconcelos

Grad. em Agronomia. Embrapa Milho e
Sorgo, C.P. 151, CEP 35701-970 Sete
Lagoas-MG

fatimavilacavasconcelos@hotmail.com

Caroline Pereira Petrillo
Mest.em Agronomia – Embrapa Milho e
Sorgo. C. P. 151, CEP 35701-970 Sete
Lagoas-MG

carolpetrillo@terra.com.br

Luciano Vilela Paiva
Dr. Agronomia. Univ. Federal de Lavras
Lavras-MG

luciano@ufla.br

Obtenção de milho tolerante a virose do mosaico pela tecnologia do RNAi

Apresentação

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, perdendo apenas para os Estados Unidos e a China. Nos últimos cinco anos, com o aumento da produção brasileira houve também um aumento da incidência de doenças, como é o caso de viroses, causando perdas de até 50%. Na busca de soluções, cultivares cada vez mais produtivas, resistentes a doenças e adaptadas às mais diversas condições de cultivo nem sempre estiveram disponíveis em um espaço curto de tempo. Uma alternativa para acelerar a identificação ou criar novos materiais seria a utilização de técnicas como manipulação gênica e transformação.

Uma das técnicas que pode ser usada para diminuir o efeito de virose na cultura do milho é do RNA de interferência (RNAi), um mecanismo natural de regulação gênica de organismos eucariontes visando o silenciamento de genes específicos. O silenciamento ocorre através da degradação do RNA alvo por formação de dupla fita dessa molécula. No caso da manipulação genética, esta dupla fita de RNA é feita artificialmente através da incorporação de um fragmento do próprio genoma do vírus duplicado em sequência invertido em relação um ao outro.

O mecanismo se baseia no cancelamento de RNAs através de enzimas presentes nas células eucarióticas que, a partir de um substrato formado por dupla fita de RNA, é capaz de degradá-lo, não permitindo a sua continuidade para a tradução de proteínas. Muitas indústrias farmacêuticas e grupos de pesquisa em biotecnologia vêm investindo nesta técnica na busca de soluções nas áreas agrônoma e médica. Sua aplicação poderá ser a chave para a resolução de muitos problemas agrônômicos antes considerados impossíveis, principalmente em relação à incidência de doenças virais em cultivares de importância comercial no Brasil e no mundo.

Introdução

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais, perdendo apenas para os Estados Unidos e a China (FAO, 2008). No Brasil, o Sul, o Sudeste e o Centro-Oeste são as regiões que apresentam as produções mais expressivas, destacando-se, principalmente, os estados do Paraná e de Minas Gerais. A produção de milho se destaca por sua presença tanto na alimentação humana quanto na alimentação animal, sendo utilizada tanto na forma *in natura* como na forma beneficiada como farelos, farinhas, pães e silagens, entre outros (Almeida, 1998).

A cada ano, a safra brasileira vem apresentando um aumento expressivo, sendo que em 2008 deve chegar em 57,8 milhões de toneladas deste grão. Um aumento de 35% quando comparado ao produzido em 2003. No entanto, a limitação da terra produtiva, os recursos de água, os estresses ambientais e o grande crescimento da população ocasionam uma grande demanda no aumento da produção, assim como na manutenção e na melhora de sua qualidade (Huang e Wei, 2004).

Dentre os estresses ambientais, encontram-se os ataques de pragas e doenças. No caso do milho, estes problemas têm se agravado desde 1990 com o aumento das áreas cultivadas, tanto na safra normal como na safrinha devido, principalmente, ao intenso cultivo em áreas irrigadas e à falta de adoção de rotação de culturas em certas áreas. Assim, doenças que antes não constituíam problema aumentaram a incidência, como é o caso das viroses e dos enfezamentos (causados por mollicutes - fitoplasmas e espiroplasmas) (Oliveira et al., 2003; Gonçalves et al., 2007).

Estimativas experimentais mostram reduções na produção de até 50% em genótipos mais susceptíveis ao mosaico (Fernandes et al., 1995). A virose do mosaico comum do milho pode ser causada por quatro diferentes potivírus: *sugarcane mosaic vírus* ou SCMV; *maize dwarf mosaic vírus* ou MDMV; *sorghum mosaic vírus* ou SrMV; e *johnsongrass mosaic vírus* ou JGMV (Almeida, 1998). Apesar disso, segundo Gonçalves et al. (2007) no Brasil apenas as espécies SCMV e MDMV são descritas infectando naturalmente o milho. O mosaico comum ataca também o sorgo e a cana-de-açúcar, culturas de grande importância econômica, além de numerosas espécies selvagens de *Poaceae* que constituem reserva de inóculo para as espécies cultivadas.

O vírus é transmitido mecanicamente e, na natureza, é disseminado de maneira não persistente. Pode ser transmitido por mais de 20 afídeos. No caso do milho, o pulgão-do-milho

(*Rhopalosiphum maidis*) é considerado o principal transmissor, ressaltando-se também, na transmissão, os afídeos *Dactynotus amrosiae*, *Schizaphis graminum* e *Hysteroneura setariae* (Fernandes et al., 1995; Shukla et al., 1994). Estes agentes transmissores são os prováveis responsáveis pela infecção de cerca de 250 espécies de gramíneas hospedeiras dos vírus do mosaico. Estas espécies de gramíneas conhecidas podem servir também como reservatório de inóculo em áreas de cultivo de milho (Fernandes et al., 1995), o que pode contribuir para o aumento da incidência do vírus em determinados locais.

Os sintomas desta virose normalmente apresentam-se em padrão de mosaico, caracterizando-se pela presença de áreas irregulares de cor verde normal, sem relação com as nervuras, sobre áreas de coloração verde claro ou sobre um fundo clorótico (Fernandes et al., 1995; Almeida, 1998). Geralmente, as áreas cloróticas se apresentam difusas, podendo ter forma definida e até serem acompanhadas de necrose (Almeida, 1998). Os sintomas iniciais da doença são pontos cloróticos no meio e na base da folha dispostos linearmente (Gonçalves et al., 2007). Estes sintomas podem ser observados na lâmina e na bainha de todas as folhas e na palha das espigas que se desenvolverem após a infecção. Algumas vezes, as plantas podem se apresentar levemente enfezadas (Fernandes et al., 1995).

Plantas possuem diferentes mecanismos para proteção contra invasão por patógenos, como barreiras físicas, metabólicos secundários e proteínas antimicrobianas. Uma vez estabelecidos, elicitadores produzidos e liberados pelo patógeno induzem novas defesas que compreendem fortalecimento da parede celular, produção de fitoalexinas e síntese de proteínas relacionadas à defesa da planta. Estes mecanismos, dentre outros, podem ser encontrados em bancos de germoplasma e sua identificação é uma das formas mais eficazes e rápidas aplicadas ao melhoramento.

Uma estratégia alternativa para obtenção de materiais resistentes a patógenos, mais especificamente a vírus, foi publicada por Grumete *et al.* (1987), quando superexpressaram parte do genoma deste patógeno na planta sensível e mostraram um aumento de resistência. A explicação dada na época foi de que a disfunção dos produtos gênicos derivados do patógeno poderia inibir o patógeno. Em trabalhos semelhantes, foi também demonstrada a expressão da capa protéica do TMV (Tobacco mosaic virus) na geração de plantas de tabaco resistentes (Abel *et al.*, 1986). Estas plantas, quando na presença do vírus, não mostravam sintomas ou mostravam um aparecimento tardio dos sintomas. Experimentos adicionais mostraram, logo a seguir, que o nível da expressão do transgene estava correlacionado com o nível de expressão da resistência (Fitchen e Beachy, 1993; Powell *et al.*, 1990).

Ao mesmo tempo, outros grupos superexpressaram genes do vírus de plantas. Em 1990, dois diferentes grupos demonstraram resultados do que se chama de “co-supressão” (Napoli *et al.*, 1990. van der Kron *et al.*, 1990). Neste caso, algumas plantas transgênicas mostraram supressão tanto do transgene como do homólogo endógeno da planta em vez da superexpressão.

Fire *et al.* (1998) utilizaram um método de silenciamento antissenso introduzindo tanto a fita senso como antissenso em *Caenorhabditis elegans* e obtiveram um silenciamento 10 vezes maior do que com a fita senso ou com a fita antissenso apenas. Em 1992, trabalhos mostraram que a transformação de plantas com o gene fora do quadro de leitura também gerava plantas transgênicas resistentes ao vírus. Evidências posteriores demonstraram que a atividade de degradação do RNA era no citoplasma e que o RNA estava sendo clivado em sítios específicos. Estes estudos básicos levaram muitos grupos de pesquisa a olhar com mais detalhe o que veio posteriormente a ser chamado de RNAi (RNA de interferência).

O RNAi é um mecanismo natural em organismos eucariotos como plantas, animais e fungos (Wang *et al.*, 2003) que envolve regulação pós-transcricional e silenciamento direto de genes. Em plantas, a resposta se espalha por plasmodesmas pelo e floema (Neilson e Sharp, 2008), o que leva a uma resposta rápida e eficaz. O RNAi está envolvido na regulação de genes ligados ao desenvolvimento, na fisiologia da planta, assim como na supressão de RNAs deletérios, como os oriundos de transposons. Outra grande importância deste tipo de regulação gênica pós-transcricional é a defesa contra ácidos nucleicos invasivos, incluindo viroses e ainda sequências repetitivas no genoma (Wang e Metzlaff, 2005; Carrington *et al.*, 2001).

Atuação do RNAi

O RNAi é um RNA de fita simples que, através de complexos enzimáticos, se liga a uma sequência homóloga com o mRNA, provocando a degradação do mesmo e impossibilitando, assim, a tradução, o que caracteriza o silenciamento gênico pós-transcricional (Malajovich, 2004).

O RNAi assemelha-se ao RNA antissenso, porém é mais simples e mais eficaz. O RNA antissenso é uma fita simples complementar – homóloga ao mRNA que se liga a este, impedindo sua tradução.

A primeira classe a participar do RNAi é o RNA dupla fita (RNA_{df}), que é formado pela complementariedade de bases de duas fitas simples de RNA e automaticamente reconhecido por um complexo enzimático chamado DICER (Chiu e Rana, 2003, Barbosa e Lin, 2004). Este primeiro complexo tem atividade RNase III e digere o RNA_{df} em fragmentos de 21 a 25pb. Estes pequenos fragmentos são reconhecidos por um segundo complexo enzimático que acopla-se a regiões homólogas destes fragmentos de 25pb no mRNA alvo (que, neste caso, será o próprio genoma do potyvírus), degradando-o e impossibilitando que o vírus produza as enzimas necessárias à sua

multiplicação (Chiu e Rana, 2003, Wang e Metzlaiff, 2005). Para que a fita de RNA_{df} ocorra neste processo, uma região conservada do genoma do vírus (cerca de 400 pb) é colocada duas vezes na construção gênica, sendo que uma delas é invertida em relação à primeira (Figura 1). Quando a construção é transcrita, ocasiona a formação de uma dupla fita de RNA. Trabalhos de RNAi com potivírus em várias plantas têm sido publicados com sucesso; contudo, a obtenção de resistência de milho ao potivírus não foi ainda descrita.

RNAi e viroses

Grande parte das plantas são infectadas por vírus que buscam replicar seus genomas. Quando isto acontece, são produzidos RNAs com potencial para formar ligações de interferência, sendo, portanto, indutores deste mecanismo de defesa (Waterhouse et al., 2001; Carrington et al., 2001). Várias linhas de pesquisas indicam que o silenciamento de RNA é em geral um mecanismo de defesa antiviral em plantas (Vance e Vaucheret, 2001). Se um vírus que contém sequências de um gene homólogo infectar a planta, o silenciamento pode ser desencadeado pelo próprio vírus alvo (Carrington et al., 2001).

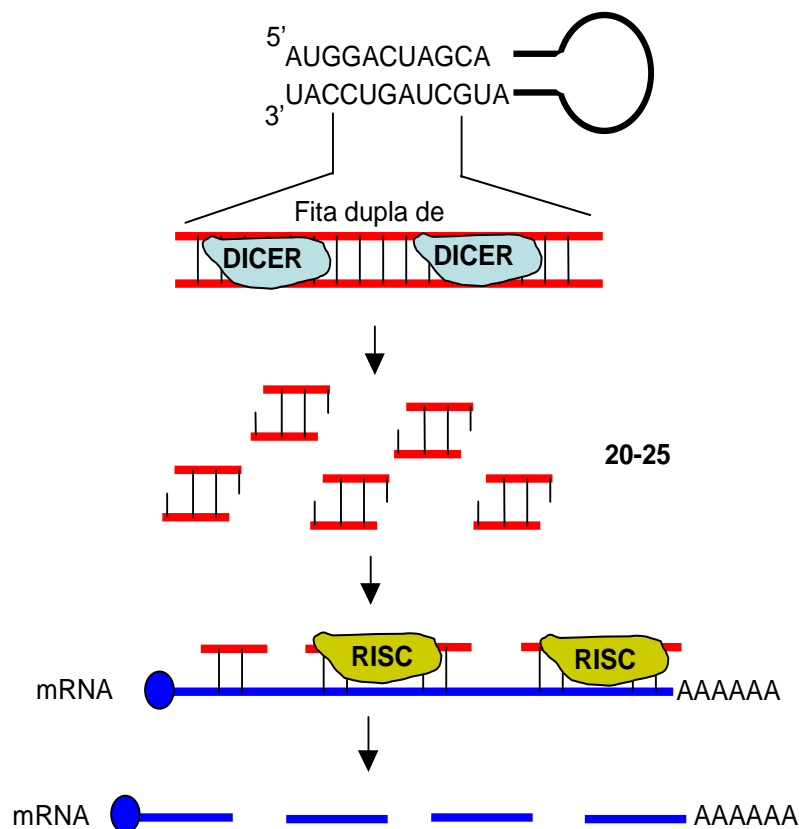


Figura 1. O RNAi é uma fita de RNA menor – em média apresenta de 21 a 25 nucleotídeos – resultante da fragmentação da dupla fita de RNA – RNA_{df} que, ligando em regiões homólogas do mRNA, induz a degradação desta molécula (Chiu e Rana, 2003). Ainda segundo estes mesmos autores, quando acontece a formação do siRNA (pequeno RNA de interferência) duplex a formação da ligação entre as fitas senso e antissenso do RNA favorece a fosforilação do complexo e, consequentemente, o reconhecimento pela RISC; uma segunda fosforilação ocorre ativando o complexo RISC para que o complexo possa agir separando as fitas de RNAi (Chiu e Rana, 2003)

Em alguns casos, o silenciamento do RNA durante a infecção pode resultar na recuperação do fenótipo, quando folhas novas emergem livres de vírus e de sintomas da infecção (Carrington et al., 2001). Isto pode se dar devido à cinética e ao padrão de propagação do sinal para o silenciamento que, segundo Neilson e Sharp (2008), é capaz de espalhar tanto de células a célula quanto através dos plasmodesmas e, sistemicamente, através do floema. Estes autores ressaltam ainda que o possível mensageiro deste sinal poderia ser um ácido nucléico. Além disso, o silenciamento de RNA em resposta a uma infecção viral pode proteger contra a infecção cruzada por viroses intercorrelacionadas (Carrington et al., 2001). Podendo, assim, os vírus tanto disparar quanto serem o alvo do silenciamento.

Montagem de construções gênicas RNAi e transformação

Para a montagem do cassete gênico para o processo do RNAi na obtenção de plantas de milho tolerantes à doença do mosaico, um fragmento gênico da região 3' do potivírus deve ser escolhido. Para tanto, devem ser utilizadas sequências de isolados do gene em questão. É de extrema importância a busca de regiões mais conservadas, pois estas sequências podem garantir a funcionalidade do RNAi nas estirpes que apresentam homologia entre as 19-25 bases do RNAi.

A escolha da sequência final deve ser baseada em softwares capazes de calcular a energia livre necessária para a formação do RNAi como o MFold. O MFold 3.2 com base na energia livre, ΔG , prediz um mínimo de ΔG necessário para que ocorra o pareamento das bases, assim como a ΔG que existe entre as bases. Este cálculo gera uma plataforma de dados entre o número de dados que se quer combinar na sequência para a formação do grampo somado ao ΔG do anelamento das bases (Zuker, 2003). Número de acessos no NCBI relativos à sequência do SCMV, vírus do mosaico da cana de açúcar: DQ315489; DQ315490; DQ315491; DQ315492; DQ315493; DQ315494; DQ315495; DQ315496; DQ315497; DQ315498; na busca de regiões mais conservadas, sequência dos genomas completos de Sorghum mosaic virus - SrMV (U57358), Sucarcane mosaic virus - SCMV (NC_003398), Johnsongrass mosaic virus - JGMV (NC_003606) e Maize mosaic virus - MDMV (NC_003377), também foram consultadas (Figura 2).

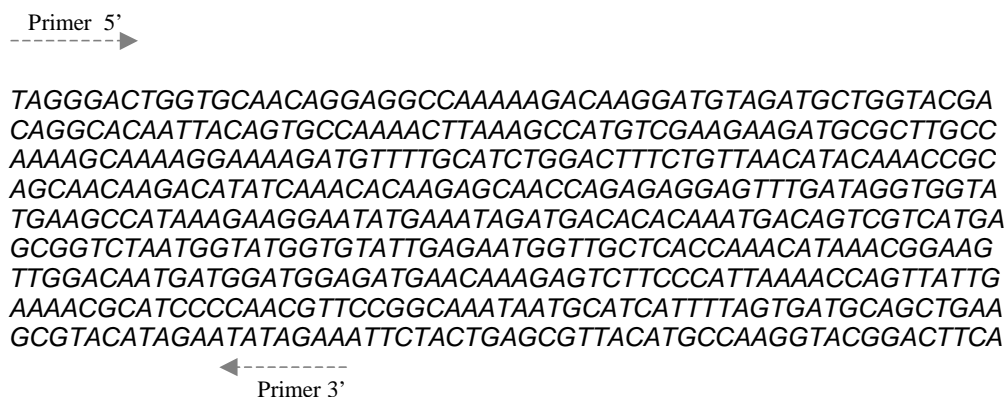


Figura 2. Sequência escolhida com base na Energia Livre (MFold 3.2) para montagem do cassete utilizando a tecnologia do iRNA

Clonagem da sequência

A partir da sequência escolhida, devem ser desenhados primers para a amplificação da sequência através de reação de PCR a partir do clone escolhido. É importante ressaltar que, no momento da construção dos primers, devem ser adicionadas as sequências de sítios enzimáticos das enzimas que serão utilizadas no processo de clonagem do fragmento, conforme demonstrado na Figura 3 abaixo.

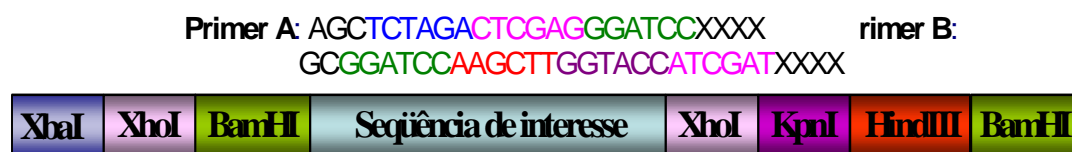


Figura 3. Descrição de sequência de primers acrescidas de sítios de clivagem de enzimas. Esquema demonstrando os tamanhos das sequências oriundas da clivagem, onde: em verde, BamHI; em azul, XbaI; em vermelho, HindIII; em rosa, XhoI; em roxo, KpnI

Confirmado o tamanho da banda a partir dos dados originados na produção da sequência, o resultado da PCR deve ser então clonado em vetor como o TOPO 2.1 (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Após a confirmação da ligação por reação de PCR, o fragmento da banda deve ser isolado do gel e deve ser realizada a reação de sequenciamento utilizando os primers M13F e M13R.

Montagem do cassete iRNA

Depois de confirmada a presença da sequência correta no vetor TOPO 2.1 (Invitrogen), este deverá ser clivado com enzimas presentes no fragmento para a clonagem. Para a clonagem da construção RNAi, o uso de vetores como pHANNIBAI e pKANNIBAL (CSIRO plant industry, Austrália) é bastante empregado para a formação do grampo do RNAi devido à presença do intron-RNA (ihpRNA – intron hairpin-RNA) por facilitar a produção das construções ihpRNA. Este tipo de construções (ihpRNA) apresenta até 100% de silenciamento em plantas transgênicas, apesar destas plantas poderem apresentar diferentes graus de silenciamento (Helliwell e Waterhouse, 2003).

Após o processo de clonagem dupla, a construção do cassete iRNA que originará o looping deve ser transferida para o plasmídeo que será empregado na transformação, como o pCAMBIA 3301 (Figura 4). Este vetor deve conter o promotor e o terminador de interesse para posterior transformação genética. Recomenda-se, então, um novo sequenciamento para a confirmação correta da clonagem. Durante todo o processo de montagem do cassete gênico, as transformações de *Escherichia coli*, bem como a extração dos

plasmídeos, recomenda-se o protocolo descrito por Sambrook et al., (1989).

Transformação das plantas

Na produção de milho transgênico via biobalística, embriões imaturos de 1 a 1,5mm foram isolados em condições estéreis e cultivados durante 30 dias em meio básico N6I (Chu et al., 1975), suplementado com 2mg/L 2,4-D. Durante o bombardeamento, foram utilizadas micropartículas de tungstênio aceleradas através de um aparelho movido a hélio. Um estoque de micropartículas de tungstênio foi preparado ressuspensando 60mg de tungstênio M10 (Sylvania, GTE Chemicals/ Towanda – USA) em 1mL de uma solução 50% glicerol estéril. Uma quantidade de 5µg de DNA da construção gênica (plasmídeo pCAMBIA 3301 contendo o cassete RNAi SCMV – figura 9) foi juntamente precipitado sobre 50µL da solução estoque de tungstênio.

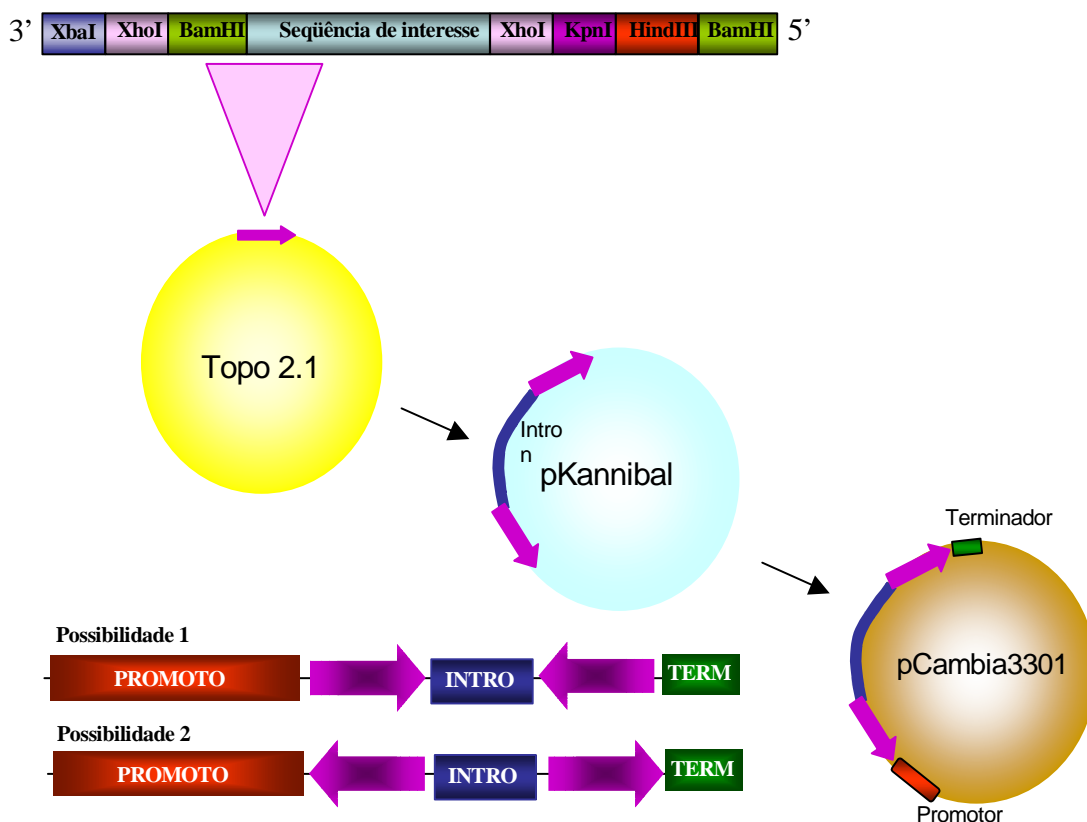


Figura 4. Plasmídeos utilizados no processo de clonagem e montagem do cassete RNAi. Em amarelo, Topo 2.1 recebendo fragmento de PCR; em azul, pKANNIBAL (CSIRO plant industry, Australia) já em transformação com a sequência de interesse em direções opostas às extremidades do intron. Em marrom, clonagem da sequência no pCAMBIA 3301 já com promotor e terminador. Demonstradas também as duas possibilidades para a formação do grupo na construção final

As partículas de tungstênio cobertas com DNA foram cuidadosamente lavadas e ressuspensas em 60µL de etanol 100%. Sete microlitros desta solução foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24mm) de membranas Kapton (Du Pont). Tais membranas foram usadas no bombardeamento dos tecidos de interesse utilizando 1100psi de pressão de gás hélio e os explantes foram posicionadas a 6cm da plataforma de lançamento das micropartículas.

Foram mantidas constantes a distância entre a câmara de gás de alta pressão e a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (8mm), a distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção (12mm) e a

pressão de vácuo (27mm Hg). A seleção de plantas transgênicas foi iniciada sete dias após bombardeamento, quando os calos de milho foram transferidos para meio básico N6S suplementados com glufosinato de amônia, o composto ativo do herbicida Finale.

Calos foram subcultivados a cada 10 dias em dosagens crescentes de glufosinato de amônia (6 a 9mg/L). Para a regeneração, calos embriogênicos foram transferidos inicialmente para meio RM, suplementado com 6mg/L glufosinato de amônia até a maturação dos embriões. Em seguida, os embriões maduros foram germinados em meio MS, suplementado com 3mg/L de glufosinato de amônia a 26°C em

luz (16h). Plantas com aproximadamente 5cm de altura foram transferidas para solo em casa de vegetação.

Resultados do experimento na casa de vegetação

As plantas transformadas com a construção gênica representando a região 3' da capa protetora do SCMV não mostraram sintomas da doenças

quando inoculadas com o vírus (Figura 5 e 6). Como controle, foram inoculadas as plantas não transgênicas do mesmo genótipo que mostraram sintomas bastante evidentes. Isso demonstra que a tecnologia do RNAi pode ser utilizada para a obtenção de genótipos tolerantes a viroses (principalmente aquelas causadas por vírus representados por fitas de RNA).

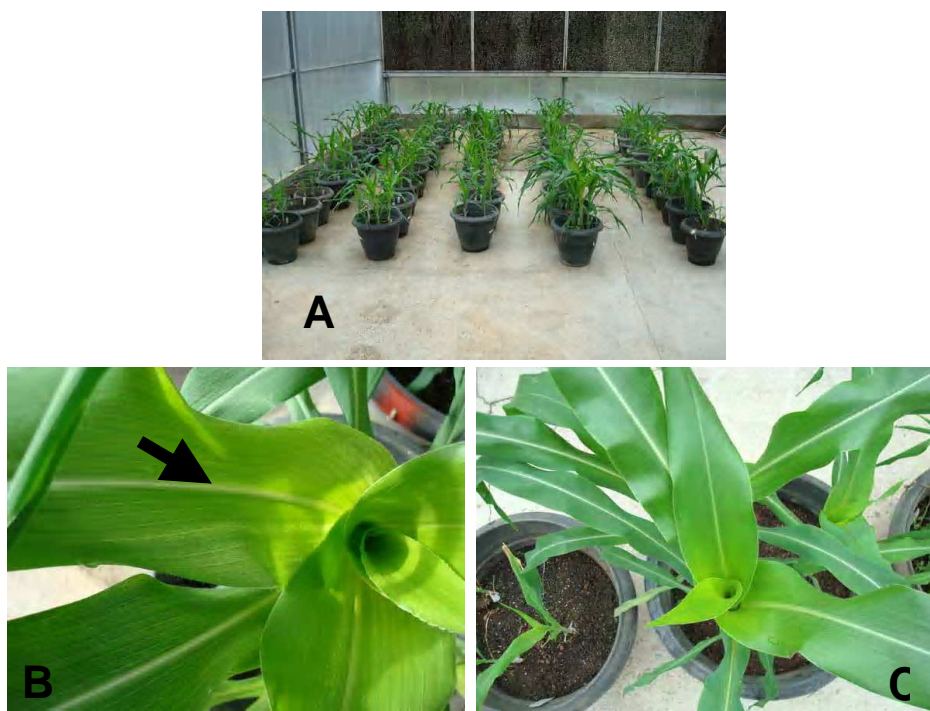


Figura 5. Descrição de experimento em casa de vegetação (A). Disposição das plantas na casa de vegetação. Plantas controle com sintomas (B) e plantas transgênicas sem sintomas (C). Seta preta na figura 6B mostra sintomas. Como controle, foram utilizadas oito plantas do genótipo Hi-II não transgênico



Figura 6. Fotos tiradas do mesmo experimento da Figura 5, contendo com uma diferença de duas semanas a mais. Plantas assintomáticas (setas) estão apresentando crescimento melhor do que as plantas sintomáticas, indicando que o sistema do RNAi está realmente protegendo a planta contra a doença. As fotos também ajudam a supor os efeitos da doença sobre a cultura. Não pode ser concluído quanto à produção de grãos, mas esta terá grande chance de ser influenciada pela produção superior de massa foliar das plantas assintomáticas

Referências bibliográficas

Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*. 1986 May 9;232(4751):738-43

ALMEIDA, A.C.L. Detecção, caracterização e aspectos epidemiológicos do complexo viral do mosaico comum do milho (*Zea mays* L.). 1998. 83 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Brasília, Brasília, DF

BARBOSA, A.S. e LIN C.J. Silenciamento de Genes Com RNA Interferência: Um Novo Instrumento Para Investigação da Fisiologia e Fisiopatologia do Córtex Adrenal. *Arq Bras Endocrinol Metab*. v. 48, nº 5, p.312-319, Outubro 2004

CARRINGTON, J.C.; KASSCHAU, K.D.; JOHANSEN, L.K. Activation and Suppression of RNA Silencing by Plant Viruses. *Virology*, v.281, p. 1-5, 2001

CHIU, Y. e RANA, T.M. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA*, v. 9, p. 1034–1048. 2003

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N.F.J.A. Doenças do Milho. Potafos Arquivo do Agrônomo - (2ª edição – ampliada e totalmente modificada), n. 2, pg 15-18. Piracicaba-SP. Setembro 1995

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):744-5. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11

Fitchen JH, Beachy RN. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu Rev Microbiol*. 1993;47:739-63

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION ON THE UNITED NATIONS. Crop Prospects and Food Situation. Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em: 29 de out. 2008

GONÇALVES, M.C., MAIA, I.G., GALLETTI, S.R., e FANTIN, G.M. Infecção mista pelo Sugarcane

mosaic vírus e Maize rayado fino vírus provoca danos na cultura do milho no estado de São Paulo. Summa Phytopathologica, v.33, n.4, p.348-352, 2007

HELLIWELL, C; WATERHOUSE, P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. Methods, v.30, p. 289–295, February 2003

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. . High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). Plant Cell Reportes, New York, v. 22, p. 793-800, 2004

MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia. Editora Axcel Books, 2004. Pg 59-72; 299. Diretrizes éticas internacionais para a pesquisa biomédica em seres humanos; Conselho de organizações internacionais de ciências médicas; Edições Loyola; Centro Universitário São Camilo; 2004

NAPOLI, C. LEMIEUX, C. JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*. The Plant Cell, Vol. 2, Pg 279-289. Abril 1990

NEILSON, J.R.; SHARP, P.A. Small RNA Regulators of Gene Expression. Cell, v.134, p. 899-902, September 2008

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O. R.; PECCI, M. G.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. Pesquisa. Agropecuária brasileira, Brasília, v. 38, n. 1, p. 19-25, jan. 2003

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W.; BRUNT, A.A. The potyviridae. Cambridge: CAB International, 1994. 516 p.

WANG, Q.; NIE, Q.; FENG, Z. RNA interference: Antiviral weapon and beyond. World Journal of Gastroenterology, v. 9, n. 8, p. 1657-1661, May 2003

WANG, M.; METZLAFF, M. RNA silencing and antiviral defense in plants. Current Opinion in Plant Biology (www.sciencedirect.com), v. 8, p. 216–222, January 2005

WATERHOUSE, P.M.; WANG, W.; FINNEGAN, J. Role of short RNAs in gene silencing. TRENDS in Plant Science, v.6, n.7, p.297-301, July 2001

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research, v. 31, n. 13, p. 3406–3415, April, 2003

Circular Técnica, 108

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 151
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2008): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino
Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães
Membros: Andrea Almeida Carneiro, Carlos Roberto Casela, Cláudia T. Guimarães, Clenio Araujo, Flavia França Teixeira, Jurandir Vieira Magalhães

Expediente

Revisão de texto: Clenio Araujo
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa